

Для познания огромного разнообразия форм жизни и ее сущности первостепенное значение имеет определение «химической индивидуальности» живого организма. Огромных успехов в изучении химического состава живых организмов и природы химических процессов, происходящих как в целостном организме, так и в изолированных органах и тканях на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях, достигла биологическая химия. В будущем развитие биологии и медицины невозможно без применения методологических принципов биологической химии, поскольку биохимия стала мощным орудием решения многих важных проблем медицины и биологии. Так, например, установление принципов структурной организации белков и нуклеиновых кислот, расшифровка механизмов биосинтеза этих полимерных молекул, а также молекулярных механизмов трансформации энергии в живых системах, определение роли биомембран и субклеточных структур, способствуют более глубокому проникновению в тайны жизни и выяснению связи между структурой индивидуальных химических компонентов живой материи и их биологическими функциями. Овладение всеми этими знаниями закономерностей и основополагающих принципов биологической химии способствует формированию у будущих специалистов соответствующего профиля, и особенно у будущих врачей, диалектико-материалистического понимания процессов жизни, а также дает новые возможности для активного вмешательства в жизненные процессы. Поскольку в формировании физиолого-биохимического мышления большую роль играет знание строения и роли химических компонентов в осуществлении физиологических функций, то очень важным является рассмотрение химического состава живых организмов. В частности, необходимыми представляются знания о принципах структурной организации белков, нуклеиновых кислот и ферментов, методах изолирования и очистки белков, определения их первичной структуры и молекулярной массы [4]. Живой организм характеризуется упорядоченностью составляющих его ингредиентов и уникальной структурной организацией, что обеспечивает как фенотипические признаки живого организма, так и многообразие его биологических функций. В этом структурно-функциональном единстве организмов, составляющем сущность всей жизни, важнейшую роль играют белки. Белки – это высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, молекулы которых построены из остатков аминокислот. Другое название этих веществ – протеины (от греч. *protos* – первый, важнейший) – более точно отражает первостепенное биологическое значение этого класса веществ. Только белки являются теми молекулярными инструментами, при помощи которых реализуется генетическая информация, так как достоверно установлено, что наследственная информация сосредоточена в молекуле ДНК клеток любых живых организмов. Без белков, ДНК не может реплицироваться, не может самовоспроизводиться, т.е. передавать генетическую информацию. Почти все

свойства живой природы связаны с белками. Для живых организмов характерны, прежде всего, широкое разнообразие белковых структур и их высокая упорядоченность. Способность живых организмов к воспроизведению себе подобных также связана с белками. Такие обязательные атрибуты живых систем, как сократимость, движение, имеют прямое отношение к белковым структурам мышечного аппарата. Наконец, жизнь немыслима без обмена веществ, т.е. без процессов анаболизма и катаболизма, в основе которых лежит деятельность каталитически активных белков – ферментов. Таким образом, белки составляют основу структуры и функций живых организмов. По образному выражению одного из основоположников молекулярной биологии Ф.Крика, белки важны, прежде всего, потому, что могут выполнять самые разнообразные функции, причем с необыкновенной легкостью и изяществом. Подсчитано, что в природе существует примерно  $10^{10}$ - $10^{12}$  различных белков, которые обеспечивают существование около  $10^6$  видов живых организмов различной сложности организации, начиная от вирусов и кончая человеком. В организме человека насчитывается более 100 000 разнообразных белков и что самое удивительное – все природные белки состоят из небольшого числа простых структурных блоков, представленных мономерными молекулами – аминокислотами, связанными друг с другом в полипептидные цепи. Природные белки построены из 20 различных аминокислот, которые могут объединяться в самой разной последовательности, поэтому они могут образовывать громадное количество белков. Итак, учитывая ведущую роль белков в живой природе и тот факт, что белки, составляя почти половину сухой массы живого организма, наделены удивительным разнообразием функций (каталитическая, транспортная, гормональная, защитная, сократительная, структурная, питательная функции, а также экспрессия генетической информации, генерирование и передача нервных импульсов, способность поддерживать онкотическое давление в клетках крови, буферные свойства, поддерживающие физиологическое значение pH внутренней среды и др.) можно сказать, что указанным биополимерам принадлежит исключительная и разносторонняя роль в живом организме. Если попытаться выделить главное свойство, которое обеспечивает многогранность биологических функций белков, то следует назвать способность белков строго избирательно, специфически соединяться с широким кругом разнообразных веществ. Эта высокая специфичность белков (сродство) обеспечивает взаимодействие ферментов с субстратами, антител с антигенами, транспортных белков крови с переносимыми молекулами других веществ и т.д. Это взаимодействие основано на принципе биоспецифического узнавания, завершающегося связыванием фермента с соответствующей молекулой субстрата, что содействует протеканию химической реакции. Высокой специфичностью действия наделены также белки, которые участвуют в таких процессах, как дифференцировка и деление клеток, развитие живых

организмов, определяя их биологическую индивидуальность [6]. Более всего богаты белковыми веществами органы и ткани животных. Источником белка являются также растения и микроорганизмы. Большинство белков хорошо растворимы в воде. Некоторые органические вещества, выделенные из хряща, ногтей, волос, рогов, костной ткани и нерастворимые в воде, также отнесены к белкам, т.к. по своему химическому составу близки к белкам мышечной ткани, сыворотки крови. В мышцах, легких, селезенке, почках на долю белков приходится более 70-80 % от сухой массы, а во всем теле человека – 45 % от сухой массы. Для изучения химического состава, строения и свойств белков, их обычно выделяют или из тканей, или из культивируемых клеток, или биологических жидкостей, например, сыворотки крови, молока, мышц, печени, кожи и др. Элементный состав белков в пересчете на сухое вещество составляет 50-54 % углерода, 21-23 % кислорода, 6,5-7,3 % водорода, 15-17 % азота и до 0,5 % серы. В составе некоторых белков присутствуют в небольших количествах фосфор, железо, марганец, магний, йод. Для подробного исследования физико-химических и биологических свойств белков, а также для изучения их химического состава и структуры обязательным условием является получение белков из природных источников в химически чистом, гомогенном состоянии. Последовательность операций по выделению белков состоит в следующем: 1. Измельчение биологического материала – гомогенизация. 2. Извлечение белков (перевод белков в растворенное состояние) – экстракция. 3. Выделение исследуемого белка из смеси других белков – очистка и получение индивидуального белка. Обычные методы органической химии, применяемые для выделения того или иного вещества из смеси (нагревание, перегонка, возгонка, кристаллизация и др.), в данном случае неприемлемы, так как белковые вещества весьма чувствительны к повышению температуры и действию многих химических реагентов (органические растворители, кислоты, щелочи). В этих условиях белки подвергаются денатурации, т.е. теряют некоторые существенные природные свойства, в частности растворимость, биологическую активность. Поэтому разработаны эффективные методы выделения белков в так называемых «мягких» условиях: при низкой температуре (не выше 4°C), с применением щадящих природную структуру химических реагентов. Гомогенизация биологического материала – ее сущность заключается в том, что перед выделением белков из биологического объекта (органы и ткани животных, растения, микроорганизмы) исследуемый материал тщательно измельчают до гомогенного состояния, т.е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры. Эту процедуру, которая называется гомогенизацией, проводят при помощи ножевых гомогенизаторов. Для выделения ряда белков из плотных животных и растительных объектов используют валковые или шаровые мельницы. Применяется также метод попеременного замораживания и оттаивания ткани, в

основе действия которого лежит разрушение клеточной оболочки, вызванное кристаллами льда. Также для дезинтеграции тканей используют ультразвук, пресс-метод (замороженный биоматериал пропускают через мельчайшие отверстия стального пресса под высоким давлением) и метод «азотной бомбы» (клетки сначала насыщают азотом под высоким давлением, затем резко сбрасывают давление – при этом выделяется газообразный азот, который как бы «взрывает» клетки). Экстракция белков – состоит в том, что большинство белков тканей хорошо растворимо в 8-10 % растворах солей. Применяют различные буферные смеси с определенными значениями pH среды, органические растворители, а также неионные детергенты – вещества, разрушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами и между белковыми молекулами. Из органических соединений, кроме водных растворов глицерина, широко используют слабые растворы сахарозы. На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает pH среды, поэтому в белковой химии применяют фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси со значениями pH от кислых до слабощелочных, которые способствуют как растворению, так и стабилизации белков. После полной экстракции белков, приступают к разделению – фракционированию смеси белков на индивидуальные белки. Для этого используют разнообразные методы: высаливание, тепловую денатурацию, осаждение органическими растворителями, хроматографию, электрофорез, распределение в двухфазных системах, кристаллизацию и др. Растворение белков в воде связано с гидратацией каждой молекулы, что приводит к образованию вокруг белковой глобулы водных (гидратных) оболочек, состоящих из ориентированных в пространстве в определенной форме молекул воды [1]. Вода, входящая в состав гидратной оболочки, по своим химическим и физическим свойствам отличается от чистого растворителя. Так, например, температура замерзания ее составляет  $-40^{\circ}\text{C}$ . В такой воде хуже растворяются сахара, соли и другие вещества. Растворы белков крайне неустойчивы, и под действием разнообразных факторов, нарушающих гидратацию, белки легко выпадают в осадок, поэтому при добавлении к раствору белка любых водоотнимающих средств (спирт, ацетон, концентрированные растворы нейтральных солей щелочных металлов), а также под влиянием физических факторов (нагревание, облучение и др.) наблюдаются дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок. Высаливание – метод, которым обычно пользуются в клинической практике при анализе белков сыворотки крови и других биологических жидкостей, а также в препаративной энзимологии для предварительного осаждения и удаления балластных белков или выделения исследуемого фермента. Сущность метода заключается в том, что при добавлении растворов солей щелочных и щелочноземельных металлов происходит осаждение белков из раствора. Обычно белок не теряет способности растворяться вновь в воде после удаления солей методами диализа или

гельхроматографии. Различные белки высаливают из растворов при разных концентрациях нейтральных растворов сульфата аммония. Поэтому данный метод нашел широкое применение в клинике для разделения глобулинов (выпадают в осадок при 50 % насыщении) и альбуминов (выпадают при 100 % насыщении) [2]. На величину высаливания белков влияют не только природа концентрация соли, но и pH среды и температура. Главную роль при этом играет валентность ионов. Действие разных ионов сравнивают не по молярной концентрации соли, а по так называемой ионной силе ( $\mu$ ), которая равна половине суммы произведений концентрации каждого иона ( $c$ ) на квадрат его валентности ( $z$ ):  $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$ . Более тонкое разделение белков плазмы крови человека на фракции достигается при использовании различных концентраций этанола при низкой температуре (от  $-3$  до  $-5^\circ\text{C}$ ). В таких условиях белки сохраняют свои нативные (природные) свойства. Таким методом очень часто пользуются для получения отдельных фракций крови, которые используются в качестве кровезаменителей. Наибольшее распространение в последнее время получили такие методы разделения белков, как хроматографические и электрофоретические методы. Хроматография – метод, основанный на способности пигментов (или любых других окрашенных и неокрашенных веществ) специфически адсорбироваться на адсорбенте. В результате происходит разделение анализируемых веществ и их концентрирование в строго определенном слое адсорбента. Затем через колонку пропускают подходящие элюенты, которые ослабляют силы адсорбции и выносят с током раствора индивидуальные вещества. Последние последовательно собирают в коллекторе фракций (принцип сорбции-десорбции) [1]. Очень эффективным способом фракционирования белков из смеси является колоночная хроматография с гидроксипатитом, различными ионообменными смолами и производными целлюлозы в качестве носителей. При выделении и очистке белков используют четыре основных типа хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную и аффинную (хроматография по сродству) – в соответствии с разными физическими и химическими механизмами, лежащими в основе каждого из них. Вообще, принцип хроматографии, разработанный еще в 1903 г. русским ученым М.С.Цветом, явился выдающимся открытием, достойно оцененным мировой научной общественностью. Вот, например, что писал в 1948 г. швейцарский ученый П.Каррер: «Никакое другое открытие не оказало такого огромного влияния и так не расширило возможности исследования химика-органика, как хроматографический анализ Цвета. Исследования в области витаминов и гормонов, каротиноидов и многочисленных других природных соединений никогда не могли бы развиваться так быстро и дать такие большие результаты, если бы они не были основаны на новом методе, который позволил установить факт наличия в природе разнообразия родственных соединений» [1]. Сейчас хроматография широко применяется не только для выделения белков, но

и для разделения множества других органических и неорганических веществ, входящих в состав живых организмов. Адсорбционная хроматография – заключается в том, что разделение компонентов смеси основано на их различной сорбируемости на твердом адсорбенте. В качестве адсорбентов используют активированный древесный уголь, гель фосфата кальция, оксиды алюминия или кремния. Адсорбент в виде суспензии с растворителем вносят в стеклянную вертикальную трубку (колонку) и равномерно в ней «упаковывают». Образец в небольшом объеме растворителя наносят на колонку – компоненты разделяемой смеси адсорбируются на адсорбенте. После этого приступают к стадии освобождения – десорбции компонентов из колонки, применяя подходящие элюенты. Сбор фракций осуществляют при помощи автоматического коллектора фракций [1].

Распределительная хроматография – в этой разновидности хроматографии в отличие от адсорбционной, твердая фаза служит только опорой (основой) для стационарной жидкой фазы. Осуществляется на колонках, так же, как и адсорбционная хроматография. В качестве стационарной фазы применяют влажный крахмал или силикагель. Образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку. Разделяемые вещества, подвергаясь многократному распределению между неподвижной стационарной фазой (водный слой) и движущейся фазой органического растворителя, с разной скоростью перемещаются ко дну колонки. При помощи коллектора фракции собирают пробы, содержащие одно вещество, затем соединяют пробы для выделения этого вещества в чистом виде.

В биохимических лабораториях, в том числе клинических, для разделения пептидов, аминокислот и других веществ широко используется хроматография на бумаге, являющаяся разновидностью распределительной хроматографии. Здесь в качестве стационарной фазы служит вода, адсорбированная целлюлозными цепями фильтровальной бумаги. Образец помещают на одном конце бумажной полосы, этим же концом бумагу погружают в подходящую смесь органических растворителей (например, бутанол-уксусная кислота-вода в определенных соотношениях). При движении растворителя по бумаге благодаря силе капиллярности происходит разделение компонентов смеси. Проявленную хроматограмму высушивают, а местоположение каждого из разделенных веществ определяют химическими или физико-химическими методами.

Ионообменная хроматография – состоит в том, что ионообменные смолы являются полимерными органическими соединениями, содержащими функциональные группы, способные вовлекаться в ионный обмен. При этом различают положительно заряженные анионообменники, представленные органическими основаниями и аминами, и отрицательно заряженные катионообменники, содержащие фенольные, сульфо- или карбоксильные группы. Из сильно- и слабоосновных анионообменников чаще используют производные полистирола и целлюлозы, несущие функциональные группы.

Такие же функциональные группы содержат триэтиламиноэтил (ТЭАЭ)- и аминоэтил (АЭ)-целлюлозы. Катионообменники представлены сульфонированными полистиролами (производные винилбензола или дивинилбензола) и карбоксиметилцеллюлозой. [3] В зависимости от заряда разделяемых белков используют подходящую ионообменную смолу, с функциональными группами которой обменивается и задерживается на колонке часть белков, в то время как другие белки элюируются с колонки. «Осажденные» на колонке белки снимают с колонки, применяя более концентрированные солевые растворы или изменяя pH элюента [1]. Новейшие методы ионообменной хроматографии, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), широко используются в фармакологии (при создании и определении лекарственных веществ), в клинической биохимии (при определении биологически активных веществ в физиологических жидкостях), в биотехнологических процессах и производствах и других областях – они позволяют определять вещества в нано-, пико- и фемтограммных количествах. Аффинная хроматография (хроматография по сродству) – основана на принципе избирательного взаимодействия белков (или других макромолекул) с закрепленными (иммобилизованными) на носителе специфическими веществами – лигандами, которыми могут быть субстраты или коферменты (когда выделяют какой-либо фермент), антигены (или антитела), гормоны или рецепторы и т.д. благодаря высокой специфичности белков к иммобилизованному лиганду, связанному с носителем (которым заполняют хроматографическую колонку), присоединяется только один какой-либо белок из смеси. Этот белок снимают с колонки элюированием буферными смесями с измененной pH или измененной ионной силой, а также введением в состав элюента детергентов, ослабляющих связи между белками и лигандами. Возможность одноэтапно выделить заданный белок или другой биополимер высокой степени чистоты является несомненным достоинством этого метода. При помощи аффинной хроматографии, например, удалось сравнительно легко выделить очищенные препараты аминоксил-тРНК-синтетаз на полиакрилгидразидагаровом геле, к которому в качестве лигандов были присоединены определенные тРНК (транспортные РНК) [1]. Гель-хроматография – или метод молекулярных сит, который широко используют в препаративных целях, особенно при очистке белков от примесей. При обработке эпихлоргидрином полисахарида декстрана образуются различной степени выраженности поперечные связи, приводящие к формированию крупных гидрофильных зерен, нерастворимых в воде и называемых сефадексами. благодаря большому сродству к воде зерна сильно набухают в водной среде с образованием геля, которым заполняют хроматографическую колонку. Разделение веществ этим методом основано на том, что большие молекулы не проникают во внутреннюю водную фазу геля, являющуюся стационарной, и остаются снаружи, двигаясь вместе с подвижной фазой вниз вдоль колонки.

Небольшие же молекулы, напротив, свободно диффундируют внутри зерен, образуя равновесную систему между подвижной и стационарной фазами, и соответственно с меньшей скоростью двигаются вдоль колонки [1]. Данный метод широко применяется в препаративной энзимологии. С помощью сефадекса разделяют белки с разной молекулярной массой. Электрофорез – это метод, детально разработанный лауреатом Нобелевской премии А.Тизелиусом, основан на различии в скорости движения (подвижности) белков в электрическом поле, которая определяется величиной заряда белка при определенных значениях pH и ионной силы раствора. В последнее время более широкое распространение получили методы зонального электрофореза белков на различных носителях, в частности, на твердых поддерживающих средах: гелях крахмала и полиакриламида, целлюлозе. Эти методы имеют преимущества по сравнению с методом свободного электрофореза и состоят преимущественно в том, что исключается размывание границы белок-растворитель в результате диффузии и конвекции, не требуется налаживания сложной аппаратуры для определения положения границы, а для анализа необходимо небольшое количество белка. Метод диск-электрофорез (от англ. discontinuous – прерывистый, перемежающийся) является одним из наиболее распространенных методов фракционирования белков, при котором используют пары буферных растворов с различными значениями pH и разной степени пористости геля. Гель-электрофорез имеет высокую разрешающую способность. Если при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге открываются всего 6 фракций, то при электрофорезе в крахмальном геле – 10, а в полиакриламидном геле – до 18 разных белковых фракций. Для того, чтобы выявить белки при электрофорезе в гелях их можно обработать следующими красителями: бромфеноловым синим, амидо черным 10В, кислотным синим 83, кумасси бриллиантовым голубым R-250 и другими. Интенсивность окраски и соответственно относительное содержание каждой белковой фракции обычно определяют денситометрически путем прямого сканирования на денситометре. В последние годы стали применять методы электрофореза белков с градиентом концентрации геля, а это значительно повышает разрешающую способность, особенно при фракционировании белков с высокой молекулярной массой, превышающей 50 000 – 100 000. Очень перспективными методами разделения белков, так же как и определения физико-химических свойств, оказались разные варианты метода изоэлектрического фокусирования – изотахофореза, основанные на проведении электрофореза в поддерживающих средах (на колонке или в тонком слое) с градиентом pH. Точное местоположение на колонке каждого белка из смеси определяется значением его изоэлектрической точки, т.е. состоянием, при котором суммарный электрический заряд белковой частицы при данном значении pH равен нулю. Для создания градиента pH в диапазоне от 3,0 до 10,0 при использовании метода изоэлектрического

фокусирования применяют смеси синтетических полиаминополикарбоновых кислот (амфолины). Широкое распространение в последние годы для фракционирования белков получили различные сочетания изоэлектрофокусирования и диск-электрофореза в полиакриламидном геле – методы двухмерного электрофореза, которые позволяют параллельно анализировать сотни и даже тысячи белковых фракций. Таким образом, перечисленные выше методы, применяемые в определенной последовательности, позволяют получить белок в очищенном состоянии. Однако такой белок все же не лишен некоторых примесей солей. Для того, чтобы полностью освободить белок от низкомолекулярных примесей, в настоящее время используют методы диализа, гельхроматографии, кристаллизации, ультрафильтрации. При диализе применяют полупроницаемые мембраны – целлофан, коллодийную пленку, у которых диаметр пор варьирует в широких пределах. Через такую мембрану белки, как правило, не диффундируют, а вот низкомолекулярные вещества легко проникают в окружающую среду. При кристаллизации белков достигают критическую точку начала осаждения белка из раствора сульфата аммония при медленном повышении температуры. Таким способом получены уже сотни кристаллических белков. Но так как при одной и той же концентрации раствора сульфата аммония могут кристаллизоваться близкие по размерам и массе разные белки, то не всякий кристаллический белок является гомогенным. Следует признать, что все-таки, лучшие результаты при освобождении белков от низкомолекулярных примесей, получают с помощью таких методов, как гельхроматография и ультрафильтрация. При ультрафильтрации продавливают растворы белка через специальные мембраны, задерживающие белковые молекулы, что позволяет не только освободить белковые растворы от низкомолекулярных примесей, но и контролировать их. Самым важным вопросом, интересующим исследователя на заключительном этапе выделения и очистки белков, является вопрос о гомогенности полученного белка. Только по одному какому-либо физико-химическому показателю оценивать гомогенность индивидуального белка нельзя. Для оценки пользуются разными критериями. Из огромного числа хроматографических, электрофоретических, химических, радио- и иммунохимических, биологических и гравитационных методов наиболее достоверные результаты при определении гомогенности белка дают ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы или хлорида цезия, диск-электрофорез в полиакриламидном геле, изоэлектрическое фокусирование, иммунохимические методы и определение растворимости белка. Об однородности исследуемого белка с большой долей вероятности могут свидетельствовать данные, если при гель-электрофорезе белок движется в виде одной узкой полосы и в этой зоне сосредоточена его биологическая активность (ферментативная, гормональная, токсическая и т.д.) [1]. В основе иммунохимического метода контроля гомогенности исследуемого

белка лежит реакция преципитации его с соответствующей антисывороткой, полученной от иммунизированных с этим белком животных. Широко применяется и метод кристаллизации белков с использованием сульфата аммония, а также метод определения растворимости белка. Последний метод основан на правиле фаз Гиббса, согласно которому растворимость чистого вещества при данных условиях опыта зависит только от температуры, но не зависит от количества вещества, находящегося в твердой фазе. Этот метод может выполняться легко и быстро в микромасштабах. Обычно определяют растворимость увеличивающегося количества исследуемого белка при постоянном количестве растворителя. Вообще же, для строго контроля и доказательства гомогенности белка требуется одновременное использование нескольких методов. Итак, все вышесказанное свидетельствует о глобальном значении белков, составляющих основу структуры и функций всех живых организмов, о том особом месте в многообразных превращениях веществ, которое они занимают. Для изучения химического состава и структуры белков обязательным условием является получение их из природных источников в чистом состоянии, для чего разработаны эффективные методы фракционирования смеси белков на индивидуальные белки.